



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（医学）
報告番号	甲第1739号
学位記番号	第1236号
氏名	間所 佑太
授与年月日	令和2年3月25日
学位論文の題名	<p>Reduced Cholinergic Activity in the Hippocampus of Hippocampal Cholinergic Neurostimulating Peptide Precursor Protein Knockout Mice</p> <p>(HCNP 前駆体タンパクノックアウトマウスの海馬では、コリン作動性神経活動が減弱している)</p> <p>International Journal of Molecular Sciences, 28:101-107, 2019</p>
論文審査担当者	<p>主査： 間瀬 光人</p> <p>副査： 澤本 和延, 道川 誠</p>

論文内容の要旨

中隔核から海馬へ投射するコリン作動性神経は、記憶、学習において重要な働きを有している。海馬由来コリン作動性神経刺激ペプチド (hippocampal cholinergic neurostimulating peptide: HCNP) は、マウス中隔核においてコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) の新生を促進するペプチドであり、これに伴いアセチルコリン (Ach) の産生も増加すると考えられている。HCNP は、21kD の HCNP 前駆体タンパク (HCNP precursor protein: HCNP-pp) の N 末端にある 11 アミノ酸残基が切り出されて生成される。

本研究では、HCNP が生体内でコリン作動性神経に与える影響を明らかにするために、HCNP-pp ノックアウト (KO) マウスを作成し、海馬へのコリン作動性神経の投射、海馬の局所フィールド電位 (local field potential: LFP)、および行動学的特徴を Control 群と比較した。

はじめに、CreERT-loxP システムを用いて、タモキシフェン存在下に HCNP-pp 遺伝子が KO されるマウスを作成した。3 ヶ月齢でタモキシフェンを投与し、HCNP-pp が KO されていることをウェスタンブロット法、免疫染色で確認した。また、このマウスの海馬に形態学的な異常は認めなかった。

次に、HCNP-pp KO マウスのコリン作動性神経投射を調べるために、海馬切片を抗 ChAT 抗体で免疫染色した。海馬では、コリン作動性神経終末の 90% 以上が中隔核に由来し、海馬の stratum oriens (SO) に投射するとされていることから、関心領域を SO に設定し、ChAT 陽性軸索の体積を定量化した。その結果、ChAT 陽性軸索の体積は、HCNP-pp KO マウスで有意に低下していることが分かった。

続いて、電気生理学的な評価を行った。海馬に電極を挿入し、LFP を測定すると、脳波様の神経振動活動 (oscillation) が測定される。中隔核から海馬へのコリン作動性神経投射は、海馬で theta oscillation という 3-12 Hz の特徴的な律動波を生み出し、これは神経ネットワーク内に新たな情報を効率的に書き込むことに貢献しているとされている。我々は、イソフルラン麻酔下でマウスの海馬 CA1 に電極を挿入して LFP を記録した後、theta oscillation の強さ (theta power) を解析した。その結果、HCNP-pp KO マウスでは有意に theta power が減少していることが確認された。

最後に、行動学的評価を行った。オープンフィールド試験、Y 迷路試験、新規物質探索試験、尾懸垂試験、強制水泳試験の 5 つを行い、記憶、不安、うつ様行動について評価した。その結果、我々の予想に反し、いずれの試験でも両群に有意な差は認められなかった。

以上の結果をまとめると、HCNP-pp KO マウスでは、①コリン作動性神経の海馬への投射が減少し、②海馬の theta power も減弱していたが、③行動学実験では有意な差を認めなかった。③の理由として、以下の 4 つの可能性が考えられた。

1. Ach 受容体の KO に関する既報告を勘案すると、行動学的異常を呈するにはいくつかの受容体障害の組み合わせが必要であり、Ach 低下そのものでは行動学的異常が見られにくい可能性がある。
2. 通常の状態では、HCNP 以外のコリン作動性神経制御因子 (BDNF など) により ChAT の機能は飽和している可能性がある。
3. 主要なコリン作動性神経制御因子として知られる TrkA を KO したマウスでは、本研究と同様にコリン作動性神経終末の減少を認めるにもかかわらず行動学的異常を示さなかったとする報告と、行動学的異常を示したとする報告が混在している。この乖離の原因として、使用したマウスの遺伝子的背景や KO の手法、マウスの週齢の違いが指摘されており、本研究でも同様の議論が当てはまる可能性がある。

4. 我々は最近、HCNP の過剰発現がコリン作動性神経を活性化する効果は、グルタミン酸作動性神経が十分に活動できていない状態においてのみ認められることを報告した。この事実を考慮すると、HCNP の機能発現に必要な「グルタミン酸作動性神経の機能障害」を有していなかったことが、本マウスで行動学的異常が出なかったことにつながった可能性がある。

今後、これらの点を踏まえた新たな実験の構築が求められる。

我々は、HCNP-pp KO マウスの海馬において、コリン作動性神経活動が減弱していることを免疫組織化学的および電気生理学的な手法を用いて明らかにした。このことは、HCNP が生体内において海馬のコリン作動性神経機能を高め、海馬のネットワークを変化させる機能を有することを示唆している。

論文審査の結果の要旨

[背景と目的] 中隔核から海馬へ投射するコリン作動性神経は、記憶、学習に重要な働きをするが、その制御系は不明な点が多い。我々の研究室では、ラット海馬可溶性成分から中隔核コリン作動性神経特異的にコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) を増加させ、アセチルコリン (Ach) の産生を促進する海馬由来コリン作動性神経刺激ペプチド (hippocampal cholinergic neurostimulating peptide: HCNP) を発見した。本ペプチドは、186 アミノ酸よりなる前駆体蛋白のN端にある 11 アミノ酸からなる。本研究では、生体内における HCNP コリン作動性神経調節作用を明らかにするために、CreERT-lox 系コンディショナル HCNP 前駆体蛋白 (HCNP precursor protein; HCNP-pp) ノックアウト (KO) マウスを作成し、海馬へのコリン作動性神経の投射、海馬の局所フィールド電位 (local field potential: LFP) , および行動学的特徴を littermate control マウスと比較検討した。

[方法と結果] 3ヶ月齢 floxed マウスにタモキシフェンを投与し、HCNP-pp が KO されていることをウェスタンブロット法、免疫染色で確認した。また、光顕学的検討では、中隔核・海馬に異常は認めなかった。次に、HCNP-pp KO マウスのコリン作動性神経投射を調べるために、中隔核コリン作動性神経終末の 90%以上が投射する海馬 stratum oriens (SO) を関心領域に設定し、ChAT 陽性軸索の体積を定量化した。その結果、ChAT 陽性軸索の体積は、HCNP-pp KO マウスで有意に低下していることが分かった。次に、海馬機能変化を検討するために LFP を測定したところ、中隔核から海馬へのコリン作動性神経活動により生じる海馬 theta oscillation (3-12 Hz) が、HCNP-pp KO マウスでは有意に減少していた。最後に、オープンフィールド試験、Y 迷路試験、新規物質探索試験、尾懸垂試験、強制水泳試験により、記憶、不安、うつ様行動について評価した。しかしながら、期待に反していずれの試験でも両群に有意な差は認められなかった。

[考察] 免疫染色法による形態評価および電気生理学的検討から、本モデルマウスにおいて HCNP は中隔核コリン作動性神経において確かに ChAT 量を介して海馬神経活動に関与していることが明らかになった。しかし、その影響は行動学的表現型に影響を与えるほどではなかった。行動学に影響を与えなかった理由として、①他の因子 (BDNF など) による代償、②記憶に重要であると考えられるムスカリン M1 受容体やニコチン $\alpha 7$ 受容体の単独 KO マウスでも行動障害が見られなかったことから、後シナプスによる特異的な Ach 受容体障害の組み合わせが行動に関与する可能性、③最近我々の、コリン作動性神経効果はグルタミン酸作動性神経が十分に活動できていない状態のみに、その効果が認められることを報告した。この事実を考慮すると、本マウスでは HCNP の機能発現に必要な「グルタミン酸作動性神経の機能障害」を有していなかったことが、行動学的異常が出なかったことにつながった可能性が考えられた。

[審査内容] 約 20 分間のプレゼンテーションの後、主査の間瀬教授から HCNP とコリン作動性神経の関係、中隔核と海馬の関係、神経軸索評価の妥当性、臨床的意義など 7 項目の質問、第一副査の澤本教授から海馬に生じる 3 種類の oscillation の機序と生理的意義、HCNP 前駆体蛋白の機能、前駆体蛋白からの切断酵素、HCNP 受容体など 7 項目の質問、第二副査の道川教授より、HCNP の海馬錐体細胞からの分泌の可能性、KO マウス海馬組織で発現が残存する理由、SO 領域の ChAT 陽性の意義、神経栄養因子の機能の可能性など 6 項目の質問がなされた。これらの全ての質問に対し、申請者から適切な回答が得られ、申請者は学位論文の内容を十分に把握し、大学院修了者としての学力を備えていると判断した。

本研究は、コリン作動性神経活動の視点から認知機能メカニズム解明と創薬に向けた基盤研究結果であり、学術的に評価される。よって、本論文著者は、博士 (医学) の学位を授与するのに値するものと判定した。

論文審査担当者 主査 間瀬 光人

副査 澤本 和延、 道川 誠